



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

F

для служебного пользования экз. №

30071

09 **SU** (11) **1614655** **A1**

(51) G 01 H 33/53

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- (21) 4435162/30-14
(22) 30.05.88
(71) Институт клинической иммунологии СО АН СССР
(72) И.О.Цырлова, Н.В.Каштакова, Е.Б.Бросалина, Е.Н.Демченко и В.А.Козлов
(53) 615.375 (088.8)
(56) Roder I. et al. Immunology, 1978, 34, p. 1017-1026.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРА ПРОЛИФЕРАЦИИ В-КЛЕТОК
(57) Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения биологически активных веществ из тка-

ней млекопитающих. Цель изобретения - повышение активности целевого продукта и упрощение способа. Мышам вводят фенолгидрозию, выделяют селезенку, из которой получают эритробласты. Эритробласты культивируют в течение 24-48 ч при 37°C. Клетки удаляют центрифугированием. Центрифугат подвергают ультрафильтрации и гель-хроматографии на сефадексе G-10 с выделением фракции мол.м. 0,5 - 2,0 кД. По сравнению с прототипом повышается активность целевого продукта в 400 раз и упрощается способ его получения.

Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения биологически активных веществ (БАЗ) из тканей млекопитающих.

Цель изобретения - повышение биологической активности целевого продукта и упрощение способа.

Способ осуществляют следующим образом.

Супернатант получают из бластных клеток эритроидного ряда, подвергают ультрафильтрации на фильтрах "Али-сон", гелефильтруют на сефадексе G-10 и получают БАЗ с мол.м. 0,5 - 2,0 кД.

П р и м е р. Перед выделением селезенки проводят обогащение ее эритробластами, вводят внутривенно мышам фенолгидразин в дозе 60 мг/кг трехкратно. В этом случае в селезенке накапливается не менее 46-90

60% эритробластов. Обогащенную эритробластами селезенку выделяют, готовят клеточную суспензию при 4°C, фильтруют через металлическую сетку и центрифугируют. Из суспензии удаляют макрофаги прилипанием из пластиковых чашках при 37°C в течение 45 мин. Собирают неприлипающие клетки и наклоняют на вершину ступенчатого градиента бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией БСА во фракциях, %: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35.

Объем каждой фракции равен 0,6 мл. Затем проводят центрифугирование при 4-5°C в течение 45 мин. На границах между концентрациями БСА образуются фракции клеток (в виде колец) соответствующей плотности. В легких фракциях 2 и 3 (19-21% и 21-23%) градиента БСА концентрируются бластные

09 **SU** (11) **1614655** **A1**

клетки, а во фракциях 4, 5 и 6 - малые лимфоциты, макрофаги, эритроциты.

Эритробласты выделяют из фракций 2 и 3 градиента БСА, отмывают 3-4 раза средой. Учет содержания эритробластов проводят морфологически и с помощью антиэритроидной сыворотки. Содержание эритробластов во фракции 2 и 3 составляет 65-80%, во фракциях 4, 5 и 6 эритробласты практически отсутствуют.

Клетки, выделенные во 2 и 3 фракциях БСА, или клетки эритробластной линии, например мышинной линии К2, культивируют 24-48 ч. Супернатант удаляют центрифугированием при 2000 об/мин. Затем супернатант подвергают ультрафильтрации на фильтрах "Amicon", собирая фракции, содержащие вещества с мол.м. 0,5 - 25 кД. Тестируют активность каждой фракции. Электрофоретический анализ показал, что основными компонентами БАЗ являются два белка с м.м. 9-12 кД. При этом происходит освобождение от большинства белковых примесей и достигается концентрация биологической активности в 1000 раз.

Далее с учетом результатов электрофоретического анализа фракцию с м.м. 0,5-25 кД подвергают хроматографии на сефадексе G-10. Элюцию проводят 20 мМ трис-HCl-буфером pH 7,5 с добавлением 0,15 мМ NaCl, объем колонки 10 мл (0,5 x 20), объем пробы 0,5 мл, скорость элюции 5 мл/ч. Детекцию белка во фракции проводят при λ 280 и 230 нм на хроматографе "МиниХром".

БАЗ содержится во фракции с мол.м. от 0,5 до 2,0 кД с концентрацией по отношению к исходному супернатанту в 20 раз. Кратность очистки по белку составляет $5 \cdot 10^4$ раз.

Обоснование достижения положительного эффекта по сравнению с про-

тотипом. Биологическую активность целевого продукта покажем условно, приравняв активность продукта по прототипу с активностью продукта по предлагаемому решению на соответствующей стадии - после ультрафильтрации. БАЗ тестировали по супрессии пролиферации лимфоцитов спонтанной и митоген-индуцированной с определением показателя индекса супрессии. После ультрафильтрации при индексе супрессии 40-50% степень очистки по белку составляла 10^3 раз. После гель-фильтрации при том же индексе супрессии степень очистки по белку составила $5 \cdot 10^4$ раз. Следовательно, активность выхода целевого продукта по сравнению с прототипом повышена в 50 раз. По сравнению с прототипом чистота целевого продукта выше в 400 раз.

Предлагаемый способ более прост за счет того, что не требуется выращивание мышей специальной линии до старого возраста. Кроме того, БАЗ можно получать из селезенки практически любых животных или клеточных линий.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения ингибитора пролиферации В-клеток путем выделения клеток из селезенки животных, инкубации их, центрифугирования, ультрафильтрации, отличающийся тем, что, с целью повышения активности целевого продукта и упрощения способа за счет использования нечуждых мышей, перед выделением клеток животным вводят фенолгидрозин, из селезенки выделяют эритробласты, после ультрафильтрации целевой продукт хроматографируют на сефадексе G-10 с выделением фракции с мол.м. 0,5-2,0 кД.

Составитель В. Литовченко

Редактор С. Ракова

Техред М. Давыд

Корректор С. Февкун

Заказ 4188/ДСП

Тираж 459

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Рауовская наб., д. 4/5

Издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101